

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

О.А. Ёршик, В.М. Ёршик, М.Л. Пивовар,  
Д.В. Моисеев, В.И. Фадеев, А.И. Жебентяев

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМЕСУЛИДА И 4-ГИДРОКСИНИМЕСУЛИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

*Предложена методика определения нимесулида и его активного метаболита 4-гидроксинимесулида в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением спектрофотометрического детектора. В процессе пробоподготовки нимесулид и 4-гидроксинимесулид с внутренним стандартом (индометацин) дважды экстрагируют смесью толуол-хлористый метилен (1:1). Исследуемые вещества элюируют смесью 0,05М фосфатного буферного раствора pH 3,0 и ацетонитрила (55:45 об/об). Расход подвижной фазы составляет 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляют при длине волны 320 нм. Концентрацию нимесулида и 4-гидроксинимесулида рассчитывают по градуировочным графикам, линейным в диапазонах концентраций 0,049 – 6,29 мкг/мл и 0,018 – 2,38 мкг/мл, соответственно.*

**Ключевые слова:** нимесулид, 4-гидроксинимесулид, ВЭЖХ, плазма крови.

### ВВЕДЕНИЕ

Нимесулид (N-(4-нитро-2-феноксифенил) метансульфонамид) применяется при внесуставных ревматических заболеваниях, болях и воспалительных процессах после оперативного вмешательства, боли и лихорадке при острых воспалительных процессах в верхних дыхательных путях, боли, связанной с дисменореей. Принимается по 100-200 мг 2 раза в сутки [1]. На территории Республики Беларусь зарегистрированы лекарственные средства нимесулида известных производителей: Нимесулид (Holden Medical B.V., Нидерланды), Нимесулид Максфарма (Maxpharma Baltija UAB, Литовская Республика), Нимесил (Laboratori Guidotti S.p.A., (Menarini Group), Италия), Нимесубел (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и др.) [2]. В УО «ВГМУ» планируется проведение испытаний биоэквивалентности лекарственного средства Нимесулид-Рн, поэтому актуальна разработка и валидация методики количественного определения нимесулида в плазме крови, пригодной для выполнения испытаний в условиях лаборатории стандартизации и контроля качества лекарственных средств.

В результате метаболизма нимесулида образуется пять различных активных метаболитов [3]. При приеме лекарственного

средства только один метаболит - 4-гидроксинимесулид – образуется в значительных количествах. Поэтому при проведении биоэквивалентных испытаний необходимо проводить количественное определение в плазме крови и нимесулида, и 4-гидроксинимесулида.

В литературе описано значительное количество методик определения нимесулида и метаболитов в плазме крови. Большинство авторов предлагают определение нимесулида и 4-гидроксинимесулида методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в сочетании со спектрофотометрическим детектированием. Авторы работы [4] предлагают проводить экстракцию диэтиловым эфиром из подкисленной хлористоводородной кислотой плазмы крови. В качестве внутреннего стандарта используют индометацин. В некоторых работах проводят пробоподготовку путем высаливания белков метанолом [5] или ацетонитрилом [6,7]. В работе [8] пробоподготовку осуществляют путем проведения двукратной экстракции толуолом при pH 1,0. В качестве внутреннего стандарта используют толбутамид. В работе [9] проводят экстракцию хлористым метиленом без использования внутреннего стандарта.

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения нимесулида

и 4-гидроксинимесулида в плазме крови, воспроизводимой в условиях аналитической базы биоэквивалентных испытаний и пригодной для анализа большого количества образцов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали рабочие стандартные образцы нимесулида (серия NMS/18100397, 99,8%, Aarti Drugs Limited), гидроксинимесулида (серия 1048-015A1, 99,1%, TLC PharmaChem) и индометацина (серия T10-236, 99,38%, Taicang Pharm. Factory).

Реактивы: ацетонитрил для хроматографии; натрия гидроксид, ч.д.а.; кислота лимонная, х.ч.; толуол ч.д.а.; хлористый метилен, ч.д.а.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Agilent HP 1100, оснащенном диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка – Zorbax Eclipse XDB C-18 4,6×150 мм, зернение 5 мкм, температура колонки 30°C. В качестве подвижной фазы использовали 0,05М фосфатный буферный раствор pH 3,0 – ацетонитрил (55:45 об/об). Расход элюента 1,0 мл/мин. Аналитическая длина волны составляла 320 нм. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

#### **Методика пробоподготовки (жидкость-жидкостная экстракция)**

В экстракционные пробирки помещают по 1,0 мл размороженной плазмы крови, 0,100 мл раствора внутреннего стандарта (метанольный раствор индометацина 8 мкг/мл), 1,0 мл 0,05 М раствора цитратного буферного раствора (pH = 3,0), 3,0 мл экстракционной смеси толуол-хлористый метилен (1:1) и экстрагируют с помощью шейкера в течение 5 минут. Для разделения фаз образцы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут и отбирают в силинизированные пробирки 2,0 мл органической фазы. В экстракционные пробирки вновь добавляют 3,0 мл экстракционной смеси и экстрагируют 5 минут. Пробы центрифугируют и после разделения фаз отбирают 3,0 мл экстракционной смеси в силинизированные пробирки.

Объединенный экстракт упаривают в токе воздуха при температуре не выше 40°C. Сухой остаток растворяют в 0,100 мл подвижной фазы и хроматографируют.

Содержание нимесулида и его мета-

болита рассчитывают по градуировочным графикам.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В качестве метода пробоподготовки нами выбрана жидкость-жидкостная экстракция. Этот метод позволяет проводить пробоподготовку одновременно множества проб. Недостаток селективности экстракции компенсируется большой концентрацией нимесулида и его метаболита в плазме крови (до нескольких мкг/мл) и достаточно большой аналитической длиной волны (320 нм), при которой трудноразрешимые компоненты матрицы не детектируются.

Согласно литературным данным [4,5,10], в качестве экстрагента используют хлористый метилен, диэтиловый эфир, толуол. Использование в качестве экстрагента диэтилового эфира нежелательно, т.к. образующиеся экстракты содержат большое количество воды, что неудобно на стадии упаривания экстракта досуха. При проведении экстракции с помощью хлористого метилена получают хроматограммы, содержащие большое количество хроматографических пиков матрицы. Степень извлечения аналита толуолом невелика (менее 50%), что может негативно сказаться на метрологических характеристиках методики. На наш взгляд, оптимальным экстрагентом является смесь хлористый метилен и толуол в соотношении 1:1. При проведении двукратной экстракции этой смесью удастся добиться высокой степени извлечения аналита (более 80%) при незначительной экстракции компонентов матрицы.

В качестве внутреннего стандарта нами выбран индометацин [4], т.к. его использование позволяет разработать методику с удовлетворительными метрологическими характеристиками, а его растворы стабильны в течение 1 месяца.

Оптимальное значение pH экстракции составляет около 3,0. Снижение значения pH экстракции менее 2,0 приводит к получению загрязненных экстрактов, а увеличение значения pH более 4,0 приводит к снижению степени извлечения внутреннего стандарта. На рисунке 1 представлена зависимость степени извлечения нимесулида, гидроксинимесулида и индометацина от значения pH водной фазы. Зависимость носит ориентировочный характер, т.к. нами проводились однократные

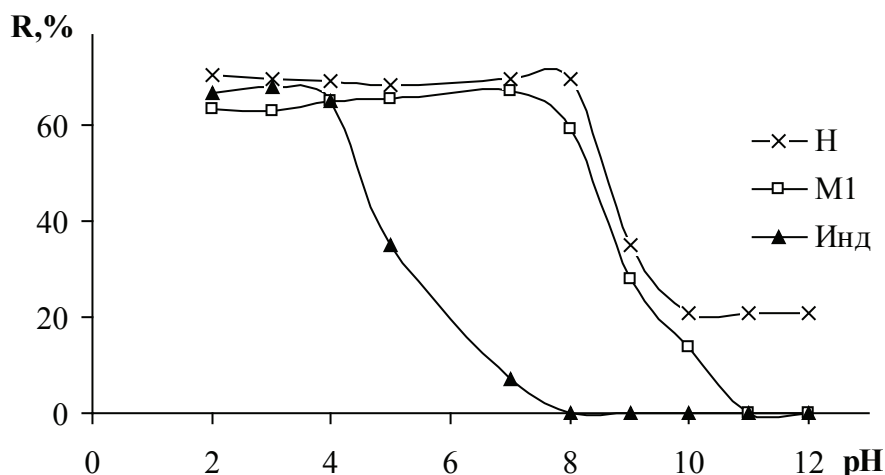


Рисунок 1 – Зависимость степени извлечения нимесулида (Н), гидроксинимесулида (М1) и индометацина (Инд) от значения pH водной фазы при проведении однократной экстракции смесью хлористый метилен-толуол (1:1)

измерения оптической плотности водной фазы после установления равновесия экстракции, при этом не учитывалось влияние растворенных органических растворителей в водной фазе на значение оптической плотности и погрешность при вычитании.

В различных литературных источниках используют аналитическую длину волны от 290 до 404 нм. Это связано с особенностями спектра поглощения нимесулида. В кислой среде он имеет плечо с высоким удельным коэффициентом поглощения в области 190-250 нм [10], поэтому авторы работ [8,9,11] выбрали коротковолновую область регистрации сигнала для увеличения чувствительности определения. Недостатком проведения измерений в этой области является значительное влияние компонентов матрицы. Поэтому авторы работ [4,6,7] предлагают проводить измерение сигнала в области максимума поглощения при 290-310 нм. В этой области длин волн влияние компонентов матрицы значительно ниже, а уменьшение чувствительности определения не критично из-за больших принимаемых доз нимесулида и высоких концентраций анализа в плазме крови. Авторы работы [5] предложили использовать аналитическую длину волны 404 нм и подвижную фазу со значением pH около 7,3. Это связано с тем, что в щелочной среде у нимесулида возникает максимум в области 380-410 нм [10].

При использовании предложенной нами подвижной фазы максимум поглощения у нимесулида и 4-гидроксинимесу-

лида наблюдается при 310 нм. Нами выбрана аналитическая длина волны 320 нм, т.к. при этой длине волны в уравнениях градуировочных графиков величина свободного члена меньше.

Состав подвижной фазы подбирали таким образом, чтобы обеспечить хорошее разрешение хроматографических пиков анализа с компонентами матрицы за минимальное время.

Разработанная методика была валидирована в соответствии с требованиями [12].

Методика обладает удовлетворительной специфичностью: на хроматограммах различных образцов плазмы, не содержащих анализа, не обнаружено хроматографических пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания хроматографических пиков нимесулида и 4-гидроксинимесулида (с соотношением сигнал/шум более 3).

Пример хроматограммы плазмы крови представлен на рисунке 2. Ориентировочные времена удерживания 4-гидроксинимесулида, нимесулида и внутреннего стандарта составляют около 4,1; 10,3 и 16,1 минут, соответственно.

Для проверки правильности и воспроизводимости в различные дни анализировали модельные растворы плазмы, содержащие различные концентрации нимесулида и 4-гидроксинимесулида из предполагаемого диапазона определяемых содержаний. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

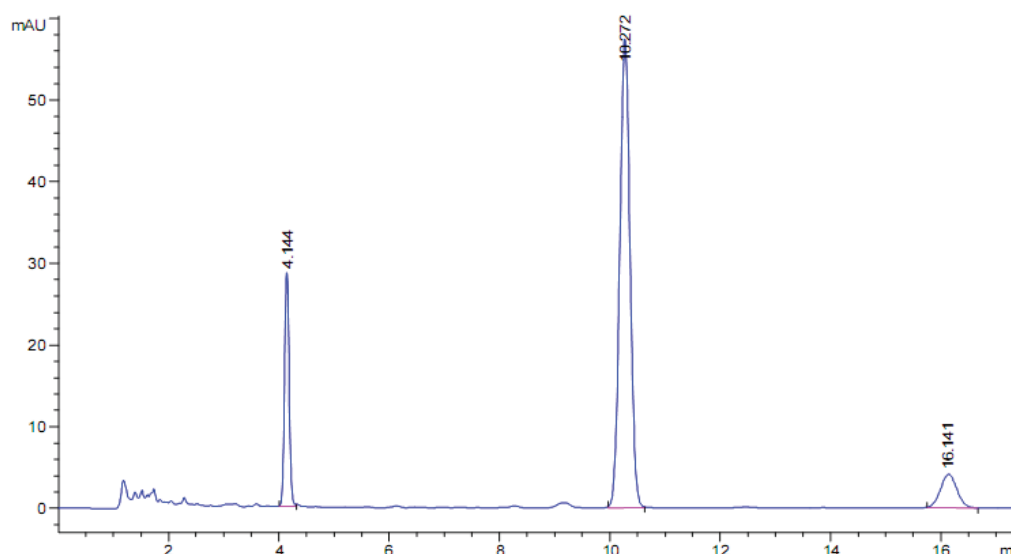


Рисунок 2 – Хроматограмма плазмы крови, содержащей нимесулид и 4-гидроксинимесулид

Таблица 1 - Результаты определения нимесулида в модельных образцах плазмы в разные дни (n=8; P=0,95)

Введено нимесулида, С, мкг/мл	Найдено нимесулида, $\bar{C}$ , мкг/мл	Открываемость, R, %	$\delta$ , %	RSD, %	$t_{\text{эксп}}$
0,049	0,049±0,004	98,5	8,7	12,6	0,5
3,14	3,14±0,04	98,4	1,2	1,8	0,3
6,29	6,29±0,08	100,4	1,2	1,7	0,1

Таблица 2 - Результаты определения 4-гидроксинимесулида в модельных образцах плазмы в разные дни (n=8; P=0,95)

Введено 4-гидроксинимесулида, С, мкг/мл	Найдено 4-гидрокси нимесулида, $\bar{C}$ , мкг/мл	Открываемость, R, %	$\delta$ , %	RSD, %	$t_{\text{эксп}}$
0,019	0,019±0,002	104,3	7,6	10,9	1,1
1,19	1,17±0,02	98,7	1,4	2,0	1,9
2,38	2,39±0,02	100,4	0,7	1,1	1,2

Правильность (R, %) и воспроизводимость (RSD, %) результатов находились в пределах критериев приемлемости (85,0-115,0% и 0-15,0%, соответственно). Относительная погрешность определения ( $\delta$ , %) не превышала 15,0%. Не наблюдалось статистически значимых отклонений от истинного значения определяемой величины ( $t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр.}} (f=8, P=0,95)$ ).

Относительное стандартное отклонение угловых коэффициентов градуировочных графиков для расчета содержания нимесулида и 4-гидроксинимесулида, полученных в различные дни, составляло 0,95 и 1,6 %, соответственно.

Методика валидировалась на предполагаемый согласно литературным данным диапазон определяемых содержаний ни-

месулида 0,049 – 6,29 мкг/мл; 4-гидрокси-нимесулида – 0,018 – 2,38 мкг/мл.

Исследуемые образцы плазмы выдерживают три цикла заморозки-разморозки. После пробоподготовки растворы устойчивы не менее 24 часов при хранении проб в автосамплере. После разморозки образцы плазмы стабильны не менее 1 часа. При хранении в жидком азоте образцы плазмы устойчивы не менее 1 месяца.

Разработанная методика использована при проведении биоэквивалентных испытаний лекарственного средства «Нимесулид-Рн», таблетки 100 мг производства ООО «Рубикон», Республика Беларусь в сравнении с лекарственным средством «Найз», таблетки 100 мг производства «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд», Индия.



## ВЫВОДЫ

Предложена методика определения нимесулида и 4-гидроксинимесулида в плазме крови методом ВЭЖХ. Все валидационные критерии, рекомендованные руководством [12], находились в пределах критериев приемлемости.

Разработанная методика позволяет провести испытания биоэквивалентности нимесулида и обеспечить надежное количественное определение лекарственного вещества и его активного метаболита в плазме крови человека.

## SUMMARY

O.A. Yorshyk, V.M. Yorshyk,  
M.L. Pivavar, D.V. Moiseev, V.I. Fadeev,  
A.I. Zhebentyaev

### DETERMINATION OF NIMESULIDE AND 4-HYDROXYNIMESULIDE IN BLOOD PLASMA

A procedure for the quantification of nimesulide and its active metabolite 4-hydroxynimesulide in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detector has been developed. Nimesulide, 4-hydroxynimesulide and internal standard (indometacin) were extracted twice with mixture toluene-methylene chloride (1:1). The drugs are eluted with a mobile phase, contained 0,05 M phosphate buffer (pH = 3,0) and acetonitrile (55:45 v/v; 1,0 ml/min) and detection at 320 nm. The calibration curve was linear over a concentration range of 0,049 – 6,29 µg/ml from the nimesulide and 0,018 – 2,38 µg/ml from the 4-hydroxynimesulide.

Keywords: nimesulide, 4-hydroxynimesulide, HPLC, blood plasma.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник / М.: АстраФармСервис – 2006 г. – 1536 с.
2. Реестр лекарственных средств Республики Беларусь [Электронный ресурс] / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Республика Беларусь. – Минск, 2012. – Режим доступа: <http://www.rceth.by/Refbank>. - Дата доступа: 10.11.2012.
3. Rajeshwari, A.P. Dubey Nimesulide. Drug therapy / A.P. Rajeshwari. - Indian pediatrics, 1997. – 34 p.
4. Carrasco-Portugal, Mdel C. Compari-

son of suspension composition on the pharmacokinetics of nimesulide in rats/ Mdel C. Carrasco-Portugal, F.J. Flores-Murrieta // Proc West Pharmacol Soc. - 2008. - № 51. - P. 58-59.

5. Ptáček, P. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma / P. Ptáček, J. Macek, J. Klíma // Journal of Chromatography B. – 2001. – Vol. 758. – P. 183–188.

6. A pharmacokinetic comparison of three pharmaceutical formulations of nimesulide in healthy volunteers / D. Jovanović [et al.] // Vojnosanit Pregl. – 2005. – Vol. 62, I. 12. – P. 887–893.

7. Determination of nimesulide and its active metabolite in plasma samples based on solvent deproteinization and hplc-dad analysis / Iulia Sora [et al.] // Revue Roumaine de Chimie. – 2007. – Vol. 52, I. 5. – P. 499–507.

8. Giachetti, C. Determination of Nimesulide and Hydroxynimesulide in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography / C Giachetti, A Tenconi // Bio-medical chromatography. – 1998. - Vol. 12. – P. 50–56.

9. Khaksa, G. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography / G. Khaksa, N. Udupa // Journal of Chromatography B. – 1999. – Vol. 727. – P. 241–244.

10. Singh, S. Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide / S. Singh, N. Sharda, L. Mahajana // International Journal of Pharmaceutics. – 1999. – V. 176, I 2. – P. 261-264.

11. Ferrario, P. Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in rat plasma, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography using solid-phase extraction / P. Ferrario, M. Bianchi // Journal of Chromatography B. – 2003. – Vol. – 785. – P. 227–236.

12. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. - 2001. - 21 p.

### Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
кафедра токсикологической  
и аналитической химии,  
тел. раб. 8(0212) 37-00-06,  
Ёришук В.М.

Поступила 09.11.2012 г.